

(19) Japan Patent Office (JP)

(12) Unexamined Patent Application Publication

S58-31998

(12) Unexamined Patent Application Publication (A)

(52) Int. Cl. ³	Identification No.	JPO File No.	(43) Publication Date: February 24, 1983
C 12 Q 1/16		6543-4B	
G 01 N 33/50		6422-2G	Number of inventions: 2
// A 61 B 6/00		7033-4C	Requested examination? Not requested

(5 pages in all)

(54) Deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid

(21) Application Number: S57-48171

(22) Application Date: March 27, 1982

Priority Claims: (32) March 27, 1981 (33) USA

(31) 248048

(72) Inventor: Mark Stephan Berninger [spelling surmised from phonetic transliteration into Japanese]

19118 Mills Choice Road, Apt. 6, Gaithersburg, [MD] 20760 USA

(71) Applicant: Bethesda Research Laboratories Incorporated, PO Box 577, Gaithersburg, [MD] 20760 USA

(74) Representative: Hiroyuki Niwa, Attorney

Specification

1. Title of Invention

Deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid

2. Scope of Claims

(1) A deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid, comprising

(a) a means of fixing said deoxyribonucleic acid (DNA) in [illegible, "denatured"?] form

on a solid support medium, and processing said acellular organism liquid;

(b) a means of bringing a solid support medium into contact with [illegible, "denatured"?] deoxyribonucleic acid that is relevant to suspicions regarding viral disease and that has been classified by means of a radioactive isotope, and re-imparting to the deoxyribonucleic acid its natural state characteristics;

(c) a means of evaluating material produced by said means (b) as regards the presence of deoxyribonucleic acid that has been classified by means of radioactive isotope,

in a method of evaluating, without in vivo culture or tissue culture technology, acellular organism liquid as regards presence of deoxyribonucleic acid that is relevant to suspicions regarding viral disease.

(2) A deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid, as described in Claim 1, having the characteristic that said acellular organism liquid is human serum.

(3) A deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid, as described in Claim 1, having the characteristic that said acellular organism liquid is cerebrospinal fluid.

(4) A deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid, as described in either Claim 1 or Claim 2, having the characteristic that said deoxyribonucleic acid that is relevant to suspicions regarding viral disease is infectious drug hepatitis B [sic, should be simply "infectious hepatitis B"] deoxyribonucleic acid.

(5) A deoxyribonucleic acid detection method when viral disease is suspected in acellular organism liquid, as described in either Claim 1 or Claim 3, having the characteristic that said deoxyribonucleic acid that is relevant to suspicions regarding viral disease is [that of] herpes simplex virus type 1.

(6) ...said acellular organism liquid is treated with organic solvent prior to means (a), and the proteins in the organic [illegible]...

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—31998

⑪ Int. Cl.³
C 12 Q 1/16
G 01 N 33/50
// A 61 B 6/00

識別記号

庁内整理番号

6543—4B

6422—2G

7033—4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)2月24日

発明の数 2

審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのある
デオキシリボ核酸の検出方法

20760 アプト 6 ガイサースブル
グ・ミルズ・チョイス・ロード
19118 番地

⑮ 特 願 昭57—48171

⑯ 出 願 人

⑰ 出 願 昭57(1982)3月27日

ベセスダ・リサーチ・ラボラト
リーズ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国メリーランド州
20760 カイサースブルグ・ピ
オ・ボックス577

優先権主張 ⑱ 1981年3月27日 ⑲ 米国(US)
⑳ 248048

㉑ 発 明 者 マーク・ステファン・ベルニン
ガー
アメリカ合衆国メリーランド州

㉒ 代 理 人 弁理士 丹羽宏之

明 細 書

1. 発明の名称

非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデ
オキシリボ核酸の検出方法

2. 特許請求の範囲

(1) ウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の
存在に対し非細胞性生物液を生体内培養又は組織
培養技術なしで評価する方法に於いて、

(a) 固体支持体上で前記デオキシリボ核酸を脱
水性した形態で固定して前記非細胞性生物液を
処理する手段と、

(b) 固体支持体を放射性同位体で分画したウイ
ルス病の疑いのある脱水性デオキシリボ核酸と
接触させて固定したウイルス病の疑いのある自
然のままのデオキシリボ核酸に特性を付与する
手段と、

(c) 放射性同位体で分画したデオキシリボ核酸
の存在に対する前記(b)の手段の生成物を評価す
る手段とから成る非細胞性生物液内のウイルス
病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(2) 前記非細胞性生物液は、人間の血清であるこ
とを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の非細
胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシ
リボ核酸の検出方法。

(3) 前記非細胞性生物液は、脳脊髄液であるこ
とを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の非細胞
性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリ
ボ核酸の検出方法。

(4) 前記ウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核
酸は、伝染性薬剤B型肝炎のデオキシリボ核酸で
あることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は
第2項いずれか記載の非細胞性生物液内のウイ
ルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(5) 前記ウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核
酸は、単純性ヘルペスウイルスタイプ1であるこ
とを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第3項
いずれか記載の非細胞性生物液内のウイルス病の
疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(6) 前記非細胞性生物液は、それを手段(a)に先立
って有機溶剤で処理して有機相内の蛋白質物質を

ルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(11) ウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸を含むデオキシリボ核酸の非細胞性生物液を検出する方法に於いて、

(a) 前記非細胞性生物液を洗剤剤及び蛋白質加水分解酵素と接触させる手段と、

(b) 前記手段(a)の生成物を有機溶剤で抽出して前記デオキシリボ核酸を含む実質的に蛋白質のない水性相を形成する手段と、

(c) 前記手段(b)の水性相をアルカリと接触させて前記デオキシリボ核酸を脱脂性する手段と、

(d) 前記手段(c)の結果生じた溶液を中和化する手段と、

(e) 前記手段(d)の溶液を固体支持体に加えてその固体支持体に前記デオキシリボ核酸を固定する手段と、

(f) 前記手段(e)の固体支持体を放射性同位体で分相したウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の前液と接触させて前記固体支持体上に固定されているウイルス病の疑いのあるデオキシ

除去することを特徴とする特許請求の範囲第1項乃至第3項いづれか記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(12) 前記手段(b)は、その手段がシンチレーションスペクトル測定装置で行なうことを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(13) 前記手段(c)の評価は、それを放射線写真装置で行なうことを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(14) 前記固体支持体は、細胞のニトロセルロースであることを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(15) 前記手段(a)は、その手段に像かな自発の利用を含んでいて固定を行なうことを特徴とする特許請求の範囲第8項記載の非細胞性生物液内のウイ

- 3 -

リボ核酸に特性を再付与する手段と、

(g) 前記固体支持体を放射性同位体で分相したウイルス病の疑いのある特性再付与したデオキシリボ核酸のために評価する手段とから成る非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(12) 前記手段(a)は、その手段が60℃乃至80℃の温度で1時間乃至10時間行われることを特徴とする特許請求の範囲第11項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(13) 前記温度は、2時間の間70℃であることを特徴とする特許請求の範囲第12項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(14) 前記手段(c)は、その手段が10乃至12.5 pHで行なわれることを特徴とする特許請求の範囲第13項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(15) 前記pHは、11.5であることを特徴とする

- 4 -

特許請求の範囲第14項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(16) 前記手段(e)の前記固体支持体は、それを前記手段(f)に先立ち60℃乃至100℃の温度で1時間乃至6時間焼くことを特徴とする特許請求の範囲第15項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(17) 前記固体支持体は、それを処理しそれに核酸が更に結合することを防止することを特徴とする特許請求の範囲第16項乃至第18項いづれか記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

(18) 前記手段(f)の前記固体支持体は、それを前記手段(g)に先立ち洗浄して非特定結合した放射線同位体で分相したウイルス病の疑いのある脱脂性デオキシリボ核酸を除去することを特徴とする特許請求の範囲第17項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の検出方法。

19. 前記手段(f)は、その手段においてシンチレーションスペクトル測定法を用いることを特徴とする特許請求の範囲に11項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の抽出方法。

20. 前記手段(g)は、その手段において放射線照射技術を用いることを特徴とする特許請求の範囲に11項記載の非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の抽出方法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は、ウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸の抽出方法に関し、具体的に曰、人間の胆液、脳脊髄液などといった非細胞性生物液内のウイルス病の疑いのあるデオキシリボ核酸（以下、D N A と称す）の抽出に際する。

従前の習知、脱特性などを加しめとする特定の核酸の系列の抽出及び量の決定の方法は、プロトコールは、研究分子生物学の分野では周知である。1961年発行の分子生物学雑誌第3巻第85ページに記載のように、Marmur及びDotyは、D

N A の熱的特性再付与の分野で多くの研究を行っているが、前記雑誌の中において、D N A と特性再付与D N A との比較が行なわれており、二重らせんコイル変化の再現性と同一二次構造の再構成が示されている。

ニトロセルロースフィルターといった固体基質に対して脱特性D N A を固定する技術及びその後、の抽出D N A による特性再付与または交配は、Gillespie 及び Siegelman が分子生物学雑誌12巻829ページに報告している。そのような技術をDonhardtが1966年の生化学及び生物物理学コミュニケーション誌23巻第5号641ページで更に修正拡張して、D N A プローブを使用して抽出脱特性D N A 系列を抽出した。リンパ様細胞株中の Epstein-Barr (エプステインバール) ウイルス病のD N A の抽出方法は、1980年の米国パテント・ナチュラール・アカデミー・サイエンス誌に Braudsmat Miller が開示している。

そのようなウイルス病の疑いのあるD N A の生成物の抽出には多くの手段が利用できるが、B型

- 7 -

肝炎ウイルスの疑いのある人間の胆液の伝染性を決定するために利用できる一つの臨床的方法は、現在、疑わしい人間の胆液をチャンパンジーの生体内に移植することを必要としている。チャンパンジーを使用すること、費用が高つくし、また、時間を消費するのであり、一方、そのような生成物の抽出は困難である。病気を加すその他の動物の抽出も、同様に、費用、信頼性のないこと、飼料増殖をしなければならないことなどの問題を抱える。

この発明の目的は、人間の胆液、脳脊髄液などといった非細胞性の生物液内のウイルス病のD N A を抽出するための新規な方法を提供することである。

この発明のもう一つの目的は、人間の胆液、脳脊髄液などといった非細胞性生物液内のウイルス病のD N A を哺乳動物を臨床的に使用しないで抽出するための有効な方法を提供することである。

この発明の更にもう一つの目的は、人間の胆液、脳脊髄液などといった非細胞性生物液内のウイ

- 8 -

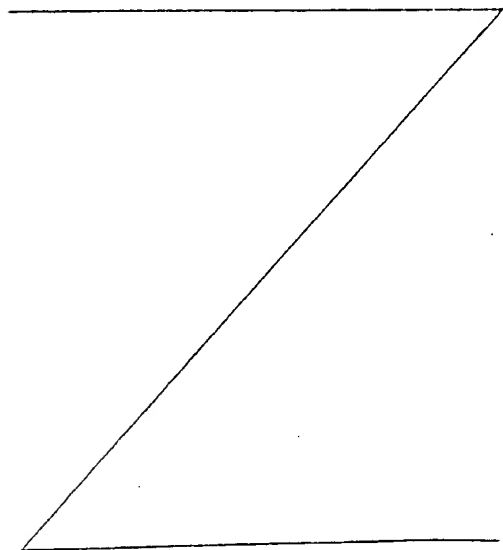
ルス病のD N A を抽出するための現在の方法よりも経済的で信頼性のある新規な方法を提供することである。

この発明のなお更にもう一つの目的は、人間の胆液、脳脊髄液といった非細胞性生物液内のウイルス病のD N A を実効的に迅速な検定を可能にして抽出するための新規な方法を提供することである。

この発明のまた更にもう一つの目的は、人間の胆液、脳脊髄液といった非細胞性生物液内のウイルス病のD N A を生物体内または試験管内で培養物を増殖しないで抽出するための新規な方法を提供することである。

この発明のこれらの目的及びその他の目的は、人間の胆液といった非細胞性生物液を処理してウイルス病の疑いのあるD N A を含むD N A を脱特性処理して固体支持物上に固定することにより、また、その固体支持物を放射性同位体で分組したウイルス病の脱特性D N A と接触させてその放射性同位体で分組したウイルス病の脱特性D N A を固

定されたウイルス病の疑いのあるDNAに対して特性再付与を可能ならしめることによつて達成される。これらの処理の後、放射性同位体で分離したウイルス病の疑いのある特性再付与DNAを抽出するための分析をする。



- 11 -

は約1.5とし、DNAの脱特性を行なう。その後、その溶液に、塩酸といった酸とトリヒドロキシアミノメタンといった緩衝剤を添加して中性pHとし、約7.0のpHを再確立する。中性pHとした後、水性相内の塩の濃度を塩化ナトリウムといった高濃度の塩を混入して増加させる。これは、後述より十分に述べるように、脱特性DNAの結合を増強する手順である。

ウイルス病の疑いのある脱特性DNAを含んでいる脱特性DNAの水溶液を、市販の純粋のニトロセルロースのフィルターといった固体支持体を通過させるか、または、それに加えて、脱特性DNAをその固体支持体に固定する。その混合物をその固体支持体に加えることは、ゆるやかな吸着を付随的に用いて便利に行かう。原料後、その固体支持体は真空下で、60℃乃至100℃の温度、好ましくは75℃で、1時間乃至6時間、好ましくは2時間、焼く。焼いた固体支持体は処理して核酸が更に固体支持体に結合するのを防止する。

ウイルス病の疑いのあるゲノムのために懸念に

特開昭58-31998(4)

B型肝炎ウイルス、単純性ヘルペスウイルスタイプ1、単純性ウイルスタイプ2、細胞巨大ウイルス、バクテリアまたは類似のものといった疑わしいウイルスを含有しているDNAを含んでいると信じられている人間の血清、脳脊髄液、尿、または類似のものといった非細胞性生物液の試料を、硫酸ドデシルナトリウムといった洗浄剤及び水性媒質中のプロテイナーゼK (Boehringer, Mannheim) といった蛋白質加水分解酵素と混合する。この混合物を、60℃乃至80℃の範囲の温度、好ましくは約70℃で、1時間乃至10時間の範囲の期間、好ましくは約2時間維持し、ウイルス微分子の分離を容易にし、それによつて、DNAの高歩出りを保証する。その結果の溶液をフェノール及びクロロホルムといった有機溶剤で抽出して大部分の蛋白質の有機相とし、それによつて、実質的にすべてのDNAを含有する水性相とする。

その水性相に、水酸化ナトリウムといった、例えば1.0モルの水酸化ナトリウム溶液といった基剤を添加して1.0乃至1.2のpH範囲、好ましく

- 12 -

符号をつけた多量の複製した再結合DNAを高濃度の比放射能で放射性同位体で分類する。この手順に使用可能な放射性同位体は P^{32} 、 I^{125} 、 I^{131} 及び D^3 である。放射性同位体で分類したウイルス病の疑いのある再結合DNAを脱特性し、固定した脱特性DNAを含んでいる固体支持体上で、前もつて定めた時間、その固体支持体上に固定されているウイルス病の疑いのある脱特性DNAの交差の特性再付与に十分な化学的並びに熱的条件下で、加える。このようにして、放射性同位体で分類したウイルス病の疑いのある脱特性再結合DNA（またはプローブ）は、その固定支持体に対して結合されているウイルス病の疑いのあるDNAの補足DNA系列と水素結合で結合せしめられる。

前もつて定めた期間後、固体支持体に洗浄手順を行ない非特定的に結合された放射性同位体で分類したウイルス病の疑いのある脱特性DNAを除去く。固体支持体は、その後、分析を行ないシンチレーションスペクトル測定法または放射線写真技術で放射性同位体で分類したウイルス病の疑い

のある特性再付与DNAを抽出する。そのような技術用の装置は、放射性同位体で分離したウイルス病の疑いのある特性再付与DNAを抽出できるのみならず、そのなかのウイルス増殖をも定量的に評価できる。

以下、この発明の実施例について説明するが、この発明の範囲は、この実施例に限定されるものではない。

実施例

1.5 mlの試験管内において、1 μ gのプロテインゼンKを100 μ lの緩衝液(100 mMの酢酸ナトリウム pH 6.5, 2% (W/V)、硫酸ドデシルナトリウム、10 mMエチレンジアミノテトラセ-2-酸、にしんの精液からの50 μ g/ml DNase、100 μ g/ml 移転DNA (酵母からの))に添加した。B型肝炎の慢性病畜保畜から300 mlの血清試料を採取し、試験管に投入して70°Cで1時間培養した。300 μ lのフェノールを添加し、混合して乳濁液とした。その後、300 μ lのクロロホルムを混合し、有機相を遠心分

- 15 -

放射性で分離した脱特性ウイルスのDNAを2 μ gのDNAから調製したが、このDNAは、ニック転換反応 (Rigby その他) 用調製子複製の母型としてプラスミドの無性生殖細胞形質pBR322に挿入したB型肝炎ウイルスのDNAから成る再結合DNAを代表するものであり、この調製によつてDNAの1 μ gにつき略 1×10^4 dpmの比放射能を有する放射性で分離したDNAを得た。ニトロセルロースフィルターを、放射性で分離したウイルスのDNAを含む特性再付与混合物に加え、そのフィルターを85°Cで10分間加熱し、急冷した。特性再付与を37°Cで18時間行つた。特性再付与に続いて、ニトロセルロースのフィルターを、1.5 M NaCl、50 mM 酢酸ナトリウムの緩衝液 (pH 6.8) と、10 μ M エチレンジアミノテトラセ-2-酸と0.5 W/V % 硫酸ドデシルナトリウムとから成る溶液で数回洗浄した。

ニトロセルロースのフィルターを透明なアセテートフィルムの間に入れ、エックス線フィルムに隣接して配置した。ネガの明暗の度を示すクリ

特開昭58-31998(5)

離で分離した。300 μ lのクロロホルムのもう一つのアリコートが無機相に混合し、遠心分離後、生じた50 μ lの水相相を96滴めマイクロフィルター板の端に導入した。50 μ lの1.0 M NaOHをその水相相に添加し、20°Cで5分間培養した。100 μ lの1.5 M NaCl、0.5 M HCl溶液と100 μ lの2.5 M NaCl、1.0 M トリヒドロキシアミノメタン溶液 (pH 7.0) とを前記試料に添加した。

前記の結果生じた溶液は直径3.0 mmの斑点を形成するように割かな真空下で純粋なニトロセルロースフィルター (Millipore Corp製) でろ過した。この試料を6 \times 550の溶液で洗い、乾燥させ、80°Cで約2時間略50ミクロンH γ にて焼いた。焼いた後、フィルターを6 \times 550、0.2のポリビニルピロリドン360 (Sigma)、0.2のウシ科の動物の血清アルブミン (留分V Armour)、0.2% Ficoll (Sigma) とにしんの精液からの0.5 μ g/mlのDNAから成る溶液に浸し、その後、65°Cで10時間培養した。

- 16 -

ーンを、薄板を光が通れないように包んだ状態で、反対側に置いた。前もつて定めた時間の経過後、フィルムを現像し、B型肝炎のウイルスのDNAの存在をフィルム上の斑点の存在で決定した。

この発明の非細胞性生物液からのウイルス病の疑いのあるDNAの抽出方法は、高度の信頼性または再現性を得るための脱特性、固定及び特性再付与という基本的手段以外に多数個の非常に望ましい処理手段を含む。従つて、有機抽出は、脱特性DNAの固体支持体への結合を妨害する蛋白質及び洗浄剤の除去を可能にする。DNAの脱特性後の無機相の中性化は、脱特性DNAの固体支持体への結合効率を改善する。焼くことは、信頼性並びにニトロセルロースの処理を増強して、DNAの非特定結合を防止する。中性化後、固体支持体を洗浄することも、その結果の信頼性を増強する。